

Mechanical translation of Japanese Patent Laid-open Publication No. 2000-342255

Date of Publication: December 12, 2000

Japanese Patent Application: No. H11-158024

Filing Date of the Application: June 4, 1999

Applicant: Japan Tobacco Inc.

Title of the invention

IMPROVEMENT IN EFFICIENCY OF GENE TRANSFER TO PLANT CELL

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the efficiency of gene transfer to a plant cell simply carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium* without damaging a tissue, to perform transformation and to better a breed by heat-treating a plant cell or a plant tissue.

SOLUTION: A plant cell or a plant tissue derived from a plant selected from the group consisting of rice plant, maize, lawn grass and tobacco is heat-treated at 33-60°C, preferably 35-55°C, more preferably 37-52°C for 5 seconds to 24 hours, especially preferably at 37-52°C for 5 minutes to 24 hours to improve the efficiency of gene transfer to a plant cell carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium*. Preferably the plant cell or plant tissue is derived from an angiosperm, a monocotyledon or a gramineous plant. Preferably after the plant cell or plant tissue is heat-treated or centrifuged, a gene transfer treatment is performed.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] How to raise the effectiveness of the transgenics to the plant cell performed through the *Agrobacterium* bacteria accompanied by heat-treating a plant cell or a plant tissue.

[Claim 2] The method according to claim 1 of performing transgenics processing, after heat-treating a plant cell or a plant tissue.

[Claim 3] The approach according to claim 1 or 2 by which heat treatment is performed in the temperature requirement which is 33 degrees C - 60 degrees C.

[Claim 4] The approach according to claim 3 by which heat treatment is performed in

the temperature requirement which is 35 degrees C - 55 degrees C.

[Claim 5] The approach according to claim 4 by which heat treatment is performed in the temperature requirement which is 37 degrees C - 52 degrees C.

[Claim 6] An approach given in claim 1 to which heat treatment is performed in for [5 seconds] - 24 hours thru/or any 1 term of 5.

[Claim 7] The method according to claim 1 or 2 of performing heat treatment under the temperature of 37 degrees C - 52 degrees C for 1 minute - for 24 hours.

[Claim 8] An approach given in claim 1 whose plant cell or plant tissue to be used is the anthophyta origin thru/or any 1 term of 7.

[Claim 9] The approach according to claim 8 the plant cell or plant tissue to be used is the monocotyledonous plant origin.

[Claim 10] The approach according to claim 9 the plant cell or plant tissue to be used is the grass origin.

[Claim 11] The approach according to claim 8 of being the vegetable origin chosen from the group to which the plant cell or plant tissue to be used changes from a rice, corn, lawn grass, and tobacco.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the approach of raising the effectiveness of the transgenics to a plant cell.

[0002]

[Description of the Prior Art] That there is little culture variation since the transformation method by Agrobacterium can obtain a transformant by short culture which can be introduced without the copy number [effectiveness is high and] of the gene into which it is introduced making few specific fields called T-DNA fragment generally etc. has the description which was excellent in many. For this reason, it is widely used as a means of the most useful transformation by various vegetable specieses.

[0003] Thus, although the Agrobacterium method is the vegetable transformation approach of having excelled very much, the actual condition is that the success or failure and effectiveness of a transformation differ from each other greatly depending

on a vegetable kind, genotype, and the plant tissue to be used (Potrykus et al.1998 (bibliography (35))). That is, there is a vegetable kind which has not succeeded in a transformation, and also there are many vegetable kinds in which only some forms have a very possible transformation. Moreover, there is also a vegetable kind which the available organization is limited and cannot deal with a lot of ingredients. It is necessary to select the network which had the target characteristic after creating many transformation vegetation, in order to have created the practical form by gene recombination. However, the class of crops which can be based on this purpose and can obtain many transformants easily is limited to the part in the present condition. Therefore, development of the amelioration technique which can solve such a trouble is desired strongly.

[0004] Although the transformation approach through *Agrobacterium* itself differs in the presentation of the culture medium used for the charge of a test specimen, or culture with a vegetable kind etc., it contacts the suspension of *Agrobacterium* in the organization which becomes an ingredient, selects a transformed cell after cocultivation, and is mostly common in actuation of creating transformation vegetation. Infection of *Agrobacterium* is performed, without usually performing processing special in addition to it to the plant tissue used as an ingredient, although sterilization processing is performed if needed (Rogers et al.1988 (bibliography (36))), Visser 1991 (bibliography (40))), McCormick 1991 (bibliography (31))), Lindsey et al.1991 (bibliography (30))). Therefore, as for amelioration of a transformation system, research has been done focusing on the class of the bacillus system of *Agrobacterium*, a vector configuration, a medium composition, a selection marker gene, or promotor, the class of sample offering organization, etc.

[0005] On the other hand, most researches based on the view of changing the plant tissue before inoculating *Agrobacterium* into the physiological condition of being easy to produce transgenics are not done. The remarkable effectiveness which utility value is very high if convertible for such a physiological condition, and makes possible the transformation of the conventionally difficult vegetable kind or genotype by simple processing of some kind in addition to improvement in transgenics effectiveness is also expected. As an example of research about pretreatment to an old plant tissue, party Kurgan (Bidney et al., 1992 (bibliography (6))) and ultrasonic (Trick et al., 1997 (bibliography (39))) processing are raised. Invasion to the vegetable in-house of bacteria is urged by both ****(ing) an organization physically, and it aims at making the plant cell used as the candidate for infection increase. However, it does not pass over this to that into which the leaf disk method (Horsch et al., 1985 (bibliography (19))) currently

performed more widely than before was developed, and it is not an approach based on a new view. In addition, extent or versatility of effectiveness are not clear and the present condition is not used as general technique.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, the purpose of this invention is offering the approach of raising the effectiveness of the transgenics to a plant cell transgenics's being performed simple, without ****(ing) an organization at effectiveness higher than the transgenics approach by the conventional Agrobacterium method.

[0007]

[Means for Solving the Problem] Invention in this application persons completed header this invention for the ability of transgenics effectiveness to be raised intentionally wholeheartedly by heat-treating the plant cell or plant tissue with which transgenics is presented in the transgenics approach which used the Agrobacterium bacteria as a result of research.

[0008] That is, the approach of raising the effectiveness of the transgenics to the plant cell performed through the Agrobacterium bacteria accompanied by this invention heat-treating a plant cell or a plant tissue is offered.

[0009]

[Embodiment of the Invention] By the approach of this invention, it is accompanied by heat-treating the plant cell or plant tissue which introduces a gene in the transgenics approach through the Agrobacterium bacteria. After heat-treating and cooling to ordinary temperature, a plant cell or a plant tissue may be the approach of making the Agrobacterium bacteria contacting, and may be the approach of making the Agrobacterium bacteria contacting, heat-treating. Moreover, after heat-treating and cooling to ordinary temperature, you may be the approach of making the Agrobacterium bacteria contacting, heat-treating. Among these approaches, as a desirable approach, after heat-treating and cooling to ordinary temperature, the approach of making the Agrobacterium bacteria contacting can be mentioned.

[0010] although heat treatment conditions are suitably chosen according to the class of vegetation to be used, the cell to heat-treat or the amount of an organization, etc. -- usually -- 33 degrees C - 35 degrees C - 55 degrees C 60 degrees C are performed still more preferably preferably in a 37 degrees C - about 52 degrees C temperature requirement. Moreover, although the time amount of heat treatment is suitably chosen according to the class of heat treatment temperature and vegetation to be used and the cell to heat-treat, or the class of organization, it is usually for [5 seconds] - about 24 hours. In addition, when heat treatment temperature is high, even if heat treatment

time amount is short, it can raise transgenics effectiveness intentionally. For example, when heat treatment temperature is 60 degrees C, transgenics effectiveness may be intentionally raised also by 5-second room [about] heat treatment time amount. On the other hand, when heat treatment temperature is the low temperature which is about 34 degrees C, transgenics effectiveness can be intentionally raised by heat treatment of dozens of hours. At 37 degrees C - 52 degrees C, although especially desirable heat treatment conditions have many cases of for [1 minute] - about 24 hours, they can set up easily the plant cell or the suitable heat treatment conditions for a plant tissue by routine experiment. In addition, if a plant cell or a plant tissue is heat-treated over a long time at the temperature of 55 degrees C or more, since a plant cell may receive a damage and transformation effectiveness may fall, when heat treatment temperature is 55 degrees C or more, it is desirable to shorten heat treatment time amount, for example, to set it as below for [1 minute] extent preferably below for 3 minutes, and to make it a plant cell not receive a damage.

[0011] The approach of this invention can be characterized by making the Agrobacterium bacteria contact, using what was heat-treated as the plant cell contacted to the Agrobacterium bacteria, or a plant tissue, or heat-treating, and can apply the well-known approach as it is as the transgenics or the transformation approach itself using the Agrobacterium bacteria.

[0012] The transgenics or the transformation approach itself to the vegetation using the Agrobacterium bacteria is common knowledge in this field, and is used widely.

[0013] It is known for many years that soil-bacteria Agrobacterium (Agrobacterium tumefaciens) will cause a crown carcinoma disease (Crown gall disease) in many dicotyledonous plants, and it was discovered in the 1970s that a Ti plasmid participates in virulence and that T-DNA which is a part of Ti plasmid further is included in a vegetable genome. The gene which participates in composition of hormone (cytokinin and auxin) required for induction of carcinoma existed in this T-DNA after that, and though it was a bacteria gene, it was shown clearly that it was discovered in vegetation. The gene cluster which exists in the VIRURENSU field on a Ti plasmid (vir field) is required for logging of T-DNA and transfer for vegetation, and in order to start T-DNA, the border array which exists in the both ends of T-DNA is required. Agrobacterium rhizogenes which is other Agrobacterium bacteria also has the same system by the Ri plasmid (drawing 3 and drawing 4).

[0014] Since T-DNA was included in the vegetable genome by infection of Agrobacterium, when the desired gene was inserted on T-DNA, it was expected that this gene would also be included in a vegetable genome. However, the Ti plasmid was difficult to insert a

gene on T-DNA on a plasmid by the standard gene engineering technique with 190 or more kbs, since it is huge. Therefore, the approach for inserting a foreign gene on T-DNA was developed.

[0015] First, LBA4404 (Hoekema et al., 1983 (bibliography (14)), C58C [1 (pGV3850)], GV3Ti11SE (Fraley et al., 1985 (bibliography (10)), etc. were produced (drawing 3)) which is the bacillus system (disarmed strains) of the De Dis arm mold with which the hormone synthetic gene was removed from T-DNA of the Ti plasmid of neoplasm nature (Zambryski et al., 1983 (bibliography (43))) By using these, two kinds of approaches of introducing into Agrobacterium T-DNA which has the inside of T-DNA of the Ti plasmid of Agrobacterium or a desired gene for a desired gene were developed. One of these is easy genetic manipulation, and insertion of a desired gene is possible for it. The middle vector which can do a duplicate with Escherichia coli all over the T-DNA field of the De Dis arm mold Ti plasmid of Agrobacterium It is the approach of introducing by homologous recombination through a three way cross method (triparental mating) (Ditta et al., 1980 (bibliography (9))). it is called the middle vector method (Fraley et al., 1985(bibliography (10)); Fraley et al., 1983(bibliography (11)); Zambryski et al., and 1983 (bibliography (43)) --) JP,59-140885,A (EP116718). another -- a binary vector (binary vector) -- the result (based on Hoekema et al. and 1983 (bibliography (14)).) that it is not necessary to exist on the plasmid same [although it is called law and a vir field is required for inclusion for the vegetation of T-DNA (drawing 3)] in order to function virA, virB, virC, virD, virE, and virG exist in this vir field, and that in which (a vegetable biotechnology encyclopedia (ENTAPU Rise Corp. issue (1989))) and a vir field contain all this virA, virB, virC, virD(s), the virE(s), and virG(s) is said. Therefore, a binary vector includes T-DNA in the small plasmid which can be reproduced with both Agrobacterium and Escherichia coli, and introduces and uses this for Agrobacterium which has the De Dis arm mold Ti plasmid. It can carry out to installation of the binary vector to Agrobacterium by approaches, such as the electroporation method and a three way cross method. There are pBIN19 (Bevan, 1984 (bibliography (5))), pBI121 (Jefferson, 1987 (bibliography (21))), pGA482 (An et al., 1988 (bibliography (2))), JP,60-70080,A (EP120516), etc. in a binary vector, many new binary vectors are built based on these, and it is used for the transformation. Moreover, Ri Also in the system of a plasmid, the same vector is built and it is used for the transformation.

[0016] Agrobacterium A281 (Watson et al., 1975 (bibliography (41))) is the bacillus system of strong virulence (super-virulent), the host range is wide, and transformation effectiveness is also higher than other bacillus systems (Hood et al., 1987(bibliography (15)); Komari, 1989 (bibliography (23))). This property is based on pTiBo542 of the Ti

plasmid which A281 has (Hood et al., 1984(bibliography (18)); Jin et al., 1987(bibliography (22)); Komari et al., 1986 (bibliography (26))).

[0017] Two new systems are developed until now using pTiBo542. One is used for the transformation of various vegetation as a high system of transformation capacity by applying these to an above-mentioned binary vector system using the bacillus systems EHA101 (Hood et al., 1986 (bibliography (17))) and EHA105 (Hood et al., 1993 (bibliography (16))) which have the Ti plasmid of the De Dis arm mold of pTiBo542. Another is a super binary vector ('super-binary' vector) (Hiei et al., 1994(bibliography (13)); Ishida et al., 1996(bibliography (20)); Komari et al., 1999 (bibliography (28)), WO 94/No. 00977, WO 95/No. 06722) system (drawing 4). Since this system consists of a plasmid which has the Ti plasmid and T-DNA of the De Dis arm mold with a vir field (virA, virB, virC, virD, virE, and virG (these may be hereafter called ***** "a vir fragment field")), it is a kind of a binary vector system. However, it differs at the point using the plasmid of the side which has T-DNA, i.e., the super (Komari, 1990a (bibliography (24))) binary vector which built into the binary vector the fragment (among these, the fragment which contains virB or virG at least preferably, the fragment which contains virB and virG still more preferably) of the vir field which removed at least one vir fragment field substantially among vir fragment fields. In addition, in order to introduce the T-DNA field which included the desired gene in Agrobacterium which has a super binary vector, the homologous recombination through a three way cross method can use as easy technique (Komari et al., 1996 (bibliography (27))). This super binary vector system It compares with above-mentioned various vector systems. Very high transformation effectiveness by many vegetable specieses bringing is clear (Hieiet al., 1994(bibliography (13)); Ishida et al., 1996(bibliography (20)); Komari, and 1990b(bibliography (25)); Li et al. (bibliography (29)) --) 1996; Saito et al., 1992 (bibliography (37)).

[0018] Especially as Agrobacterium bacteria which serve as a host in the approach of this invention, although not limited, it is Agrobacterium tumefaciens (for example, above-mentioned Agrobacteriumtumefaciens LBA4404 (Hoekema et al., 1983 (bibliography (14)), and EHA101 (Hoodet al., 1986 (bibliography (17))) can be used preferably.)).

[0019] If it is a transgenics system based on the manifestation of the gene cluster of the pathogenic (vir) field in the Agrobacterium bacteria according to the approach of this invention, significant effectiveness can be acquired without being limited especially. Therefore, an above-mentioned middle vector, a binary vector, the binary vector of strong virulence, a super binary vector, etc. can be used also to which vector system, and

the effectiveness by this invention can be acquired. It is the same when a different vector system which changed these vectors is used (for example, some or all of a vir field that starts some or all of a vir field of the *Agrobacterium* bacteria, and is additionally incorporated into a plasmid is started, and it introduces into *Agrobacterium* as a part of new plasmid). Moreover, although it is natural, according to the approach of this invention, also in the *Agrobacterium* bacteria of a wild type, the introductory effectiveness of the T-DNA field of a wild type can be raised to vegetation, and the efficiency of infection can be improved as a matter of fact.

[0020] The gene of the request which it is going to introduce into vegetation can be included in the restriction enzyme part in the T-DNA field of the above-mentioned plasmid with a conventional method, and can be chosen based on a selective marker with the suitable gene which has the resistance over drugs built into the plasmid concerned being simultaneous or separately, such as a kanamycin and paromomycin. It is large-sized and the thing with many limit parts has that it is not necessarily easy to introduce desired DNA in a T-DNA field by the technique of the usual subcloning. In such a case, the target DNA can be introduced by using intracellular homologous recombination of the *Agrobacterium* bacteria by the three way cross method.

[0021] Moreover, actuation which introduces a plasmid into the *Agrobacterium* bacteria, such as *Agrobacterium tumefaciens*, can be performed with a conventional method, and the approach by chemical processing of the above-mentioned three way cross method, the electroporation method, the electroinjection method, PEG, etc. is included as an example.

[0022] The gene which it is going to introduce into vegetation is fundamentally arranged between the right-and-left boundary arrays of T-DNA like a Prior art. However, since the plasmid is annular, one is sufficient as the number of boundary arrays, and when it is going to arrange two or more genes to a different part, there may be three or more boundary arrays. Moreover, in the *Agrobacterium* bacteria, it may be arranged on Ti or a Ri plasmid, or may be arranged on other plasmids. Furthermore, it may be arranged on the plasmid of two or more classes.

[0023] The approach of performing transgenics through the *Agrobacterium* bacteria can be performed by only contacting a plant cell or a plant tissue to the *Agrobacterium* bacteria. For example, the *Agrobacterium* bacterial suspension of the cell concentration of $10^6 \sim 10^{11}$ cell / ml extent can be prepared, and it can carry out by carrying out cocultivation of a plant cell or the plant tissue for several days on a solid medium after grade immersion for 3 ~ 10 minutes into this suspension.

[0024] The cell or organization with which transgenics is presented may not be limited

at all, may be a leaf, a root, a stem, a fruit, and which other parts, and may be a germ which is not dedifferentiating a thing like a callus which dedifferentiated, either. Moreover, anthophyta may be desirable, and as long as it is anthophyta, a dicotyledonous plant or a monocotyledonous plant is sufficient, although a vegetable class is not limited at all, either.

[0025] As the following example is shown concretely, according to the approach of this invention, as compared with the conventional Agrobacterium method, the effectiveness of transgenics improves intentionally. Moreover, the transgenics effectiveness of the vegetation for which transgenics was possible not only improves by the Agrobacterium method from the former, but transgenics became possible for the first time by the approach of this invention to the vegetation which was not able to carry out transgenics depending on the conventional Agrobacterium method. Therefore, by the conventional approach, making possible the thing in which transgenics was impossible is also included by "improvement in the effectiveness of transgenics" in this invention (that is, I think that the transgenics effectiveness which was 0% conventionally was raised).

[0026]

[Example] Hereafter, this invention is more concretely explained based on an example. But this invention is not limited to the following example.

[0027] Example 1 (1) The light of the morning of a sample offering organization and a sample offering bacillus system japonica rice and IR72 of the Indica rice were used as the sample offering form, and the callus of an unripe germ and the unripe germ origin was used as an ingredient. The sample offering unripe germ was extracted from the unripe seed for one - two weeks after the bloom, and was prepared by Hiei et al. and the approach of 1994 (bibliography (13)). Namely, 70% after the bloom and after removing ** for the unripe seed on seven - the 12th After disinfecting by being immersed in ethanol for 10 minutes 30 seconds and 1% at a sodium hypochlorite, the unripe germ was taken out and it considered as the charge of a test specimen. Moreover, the unripe germ origin callus was obtained by cultivating an unripe germ for two weeks on 2-N6 culture medium (Hiei et al. 1994 (bibliography (13))) containing 4 g/l Gelrite.

[0028] As the bacillus system and plasmid vector of Agrobacterium, LBA4404 (pIG121Hm) (Hiei et al., 1994 (bibliography (13))), LBA4404 (pNB131) (refer to drawing 2), and LBA4404 (pTOK233) were used (Hiei et al., 1994 (bibliography (13))).

[0029] Construction of pNB131 was performed as follows. pSB31 (Triparental mating after introducing Ishida et al. and 1996 (bibliography (20))) into 392 shares of Escherichia coli LE -- it introduced into 4404 shares of Agrobacterium LBA which has pNB1 (Komari et al., 1996 (bibliography (27))) by law (Ditta et al. and 1980

(bibliography (9))). pNB131 was obtained by homologous recombination between pNB1 and pSB31 within *Agrobacterium*.

[0030] In the T-DNA field of pIG121Hm, it has the kanamycin resistant (nptII) gene controlled by the promoter of a nopaline synthesis enzyme (nos) gene, the hygromycin tolerance (hpt) gene controlled by 35S promoter of a cauliflower mosaic virus (CaMV), and the GUS gene (Ohta et al, 1990 (bibliography (33))) between which it is controlled by 35S promoter and placed by the intron of the catalase gene of a castor seed.

[0031] In the T-DNA field of pNB131, it has the bar gene controlled by 35S promoter, and the GUS gene (****) between which it is controlled by 35S promoter and placed by the intron.

[0032] In the T-DNA field of pTOK233, it has the nptII gene controlled by the nos promoter, the hpt gene controlled by 35S promoter, and the GUS gene (****) between which it is controlled by 35S promoter and placed by the intron. pTOK233 is a super binary vector (Komari et al., 1999 (bibliography (28))) with high transformation capacity.

[0033] (2) The heat treatment sample offering organization (5 - 200 mg) was immersed in the tube containing the sterilized water of 1 ml. It is 1 minute to the water bath which set the tube as each processing temperature. - It heat-treated by being immersed for dozens hours. The contrast processing division was because it puts at a room temperature (25 degrees C). The tube was cooled with the stream after heat treatment termination.

[0034] (3) Except for the sterilized water after inoculation and cocultivation heat treatment and inside a tube, the suspension of *Agrobacterium* was added and it stirred with the vortex mixer for 5 - 30 seconds. Preparation of bacteria suspension is Hiei et al. (1994 (bibliography (13))) (it depended.). Namely, the colony of *Agrobacterium* cultivated for three - ten days on AB culture medium (Chilton M-D et al., 1974 (bibliography (8))) is written with a platinum loop. a correction AA culture medium (AA main mineral, AA amino acid, and AA vitamins (Toriyama K, 1985 (bibliography (38))) --) MS minute amount salts (Murashige T., 1962 (bibliography (32))) and 1.0 g/l Casamino acids and 100 μ M ASETOSHI phosphorus gon and 0.2 M Cane sugar and 0.2 M It suspended in the glucose. Moreover, the bacillus consistency of suspension was adjusted to 1×10^9 cfu [about 0.3 -]/ml. After putting at a room temperature for about 5 minutes, it ****ed to the culture medium for cocultivation. In the culture medium of the cocultivation of an unripe germ, it is 8 g/l. 2-N6-AS (Hiei et al.1994 (bibliography (13))) which made agarose the culture-medium solidification agent was used. 2-N6-AS (Hiei et al.1994 (bibliography (13))) containing 4 g/lGelrite was used for the culture medium of the cocultivation of a callus. After carrying out cocultivation for three - seven days 25

degrees C and under dark, the GUS gene expression investigation by X-Gluc processing was presented with a part of unripe germ or callus by Hiei's and others (1994) (bibliography (13)) approach. That is, he is an organization immediately after cocultivation processing 0.1% Triton X-100 Included 0.1 M Phosphate buffer solution (pH6.8) It was immersed and put at 37 degrees C for 1 hour. 1.0 mM after a phosphate buffer solution removes Agrobacterium 5-BUROMO-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid (X-gluc) and 20% The phosphate buffer solution containing a methanol was added. After processing at 37 degrees C for 24 hours, it gazed at the organization which shows blue coloration under the microscope. [0035] (4) After the selection cocultivation of the transformed cell in a Japanese rice, after Metz divided into 4-7 the scutellum part which carried out thickening growth about the unripe germ, about the callus, it cultivated under 30-degree-C light condition during several days by 2-N six culture media (****) which do not contain selection drugs, without performing division. Next, 50 - 100 mg/l hygromycin and 200 mg/l It transplanted on 2-N6 culture medium containing either of the paromomycins, and cultivated for about two to three weeks under 30-degree-C light condition. In addition, CC culture medium (Potrykus et al.1979 (bibliography (34))) except coconut water was used, including 2,4-D of 2 mg/l in the culture medium which contains 10 mg/l phosphino SURISHIN (PPT) in selection drugs. The drug tolerance callus formed on the culture medium was transplanted to six to N7 culture medium (Hiei et al.1994 (bibliography (13))) which contains the selection drugs of this concentration, respectively, and secondary selection was performed under 30-degree-C light condition during seven days. In each culture medium, it is 250 mg/l. Cefotaxime and 250 mg/l The carbenicillin disodium was combined or 250 mg/l cefotaxime was added independently. Moreover, 4 g/l Gelrite was used for the culture-medium solidification agent. To the drug tolerance callus increased on the culture medium X-Gluc processing was performed and GUS gene expression was investigated.

[0036] (5) The unripe germ was processed for 10 minutes at result various processing temperature, cocultivation with LBA4404 (pTOK233) was performed, and the result of having investigated the transient manifestation of a GUS gene was shown in Table 1 and 2. When heat treatment around 46 degrees C was carried out compared with a non-processed division, the GUS manifestation field in a scutellum was clearly large, and was understood to be what transgenics produced by high frequency more. On the other hand, heat treatment of 52 degrees C or more may give a damage to a plant tissue, and controlled growth of an unripe germ in 55-degree-C processing, and a GUS manifestation was not observed, either. In the short-time processing for 10 minutes,

expansion of the clear GUS manifestation field in 43-degree-C experimental plot was not accepted.

[0037] After carrying out cocultivation of *Agrobacterium* to a rice unripe germ, the selection result of the transformation callus cultivated and obtained on the culture medium containing selection drugs was shown in Table 3 and 4. In the trial which inoculated LBA4404 (pIG121Hm), the transformation callus which shows hygromycin tolerance and uniform GUS gene expression at the effectiveness of 12.0 % was obtained from the division intercept of an unripe germ which has not been heat-treated (Table 4). On the other hand, with 46 degrees C and the division intercept of the unripe germ which performed heat treatment for 5 minutes, the transformation callus was obtained at the effectiveness of 29 % (Table 3). Moreover, at selection by paromomycin, it was obtained from the intercept of an unripe germ which has not been heat-treated at the effectiveness of 12.0 % to the transformation callus having been obtained at the low effectiveness of 2.0 % with 46 degrees C and the unripe germ intercept which performed heat treatment for 5 minutes (Table 4). In the trial which inoculated LBA4404 (pNB131), the transformation callus which shows PPT resistance and uniform GUS gene expression at the effectiveness of 29.0 % was obtained from the intercept of an unripe germ which has not been heat-treated (Table 5). On the other hand, with the intercept of the unripe germ which performed 46 degrees C and heat treatment for 5 minutes, the transformation callus was obtained at 50.0% of effectiveness (Table 5). By heat treatment to an unripe germ, improvement in remarkable transformation effectiveness was accepted for all.

[0038] After carrying out cocultivation of *Agrobacterium* LBA 4404 (pTOK233) to a rice unripe germ origin callus, the selection result of the transformation callus cultivated and obtained on the culture medium containing hygromycin was shown in Table 6. The transformation callus which shows hygromycin tolerance and uniform GUS gene expression at the effectiveness of 24.1 % was obtained from the callus which has not been heat-treated (Table 6). On the other hand, at the callus which performed heat treatment for 46 degrees C, 3 minutes, or 10 minutes, the transformation callus was obtained at the effectiveness of 36.2 - 36.9 % (Table 6). As mentioned above, improvement in remarkable transformation effectiveness was accepted also in heat treatment to a rice callus.

[0039] When examination was further added for the GUS manifestation after cocultivation to the index about processing temperature and the relation of the processing time using the unripe germ and the callus, in the case of temperature with short-time processing comparatively low in a hotter case, processing of long duration

raised the effectiveness of transgenics. That is, in the 60-degree C heat treatment division, the clear effectiveness of raising transgenics effectiveness by processing of several hours to dozens of hours was accepted at 35 degrees C by processing for several seconds.

[0040] Hiei et al. (bibliography (1994) (13)) has reported that a transformation can perform the callus of a rice at effectiveness comparatively high as an ingredient. Moreover, Aldemita RR. et al. and 1996 (bibliography (1)) have reported the example of a transformation which used the unripe germ of a rice. In order to be stabilized more efficiently and to enforce such transformation technique, the heat-treating method mentioned above is very effective. Although it is not easy to always obtain the suitable unripe germ ingredient for a transformation that especially an unripe germ tends to be influenced by the cultivation environment, it is possible to maintain the high transformation effectiveness stabilized by heat-treating. Hiei et al. (bibliography (1994) (13)) It was shown that the super binary vector which is a high vector of transformation capacity raises the transformation effectiveness of a rice. Moreover, according to Aldemita and Hodges (bibliography (1996) (1)), the transformant has been obtained only in the trial using LBA4404 (pTOK233) of a super binary vector. When the usual binary vector is used, the heat-treating method in this research is equal to a super binary vector, or can acquire the transgenics effectiveness beyond it. Moreover, it is possible by using together a super binary vector and the heat-treating method to raise effectiveness further. Furthermore, it is imagined as what can obtain a transformant also in the form which was not able to obtain a transformant at all until now by using the heat-treating method.

[0041]

[Table 1] Table 1 Transient manifestation of GUS gene in processing temperature and unripe germ scutellum (form: IR72)

Sample-offering bacillus system: LBA4404 (pTOK233), Heat-treatment time amount: 10 minutes, Cocultivation period: Four days [0042]

[Table 2] Table 2 Transient manifestation of GUS gene in processing temperature and unripe germ scutellum (form: morning light)

Sample-offering bacillus system: LBA4404 (pTOK233), Heat-treatment time amount: 10 minutes, Cocultivation period: Three days [0043]

[Table 3] Table 3 Heat treatment to unripe germ, and efficiency of selection of transformation callus (form: morning light)

Sample-offering bacillus system: LBA4404 (pIG121Hm), Cocultivation period: Five days, Hm:hygromycin [0044]

[Table 4] Table 4 Heat treatment to unripe germ, and efficiency of selection of transformation callus (form: morning light)

Sample-offering bacillus system: LBA4404 (pIG121Hm), Cocultivation period: Five days, Pm:paromomycin [0045]

[Table 5] Table 5 Heat treatment to unripe germ, and efficiency of selection of transformation callus (form: morning light)

Sample-offering bacillus system: LBA4404 (pNB131), Cocultivation period: Six days [0046]

[Table 6] Table 6 Heat treatment to callus, and efficiency of selection of transformation callus (form: morning light)

Sample-offering bacillus system: LBA4404 (pTOK233), Cocultivation period: Three days [0047] The corn unripe germ (it receives from a form A188 and a biomass lab, the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries) of example 2 magnitude about 1.2 mm was taken out in sterile, and it put into the tube of 2 ml containing a LS-inf liquid medium. After washing once by this liquid medium, this liquid-medium 2.0 ml was newly added. The tube was immersed in the 46-degree C water bath for 1 to 10 minutes.

Contrast was put between coincidence at the room temperature. Except for a culture medium, to the LS-inf liquid medium containing the ASETOSHI phosphorus gon of 100 mM, by abbreviation 1×10^9 cfu/ml concentration *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pIG121Hm), EHA101 (pIG121Hm), LBA4404 (above) (pTOK233) It indicates to Hiei et al. and 1994 (bibliography (13)). Liquid 1.0 ml which suspended LBA4404 (pSB131) (Ishida et al., 1996 (bibliography (20))) or LBA4404 (pNB131) (it indicates to an example 1 and drawing 2) was added, and it stirred with the vortex mixer for 30 seconds. It is 10 so that a germ axial plane may touch a culture medium, after putting at a room temperature for 5 minutes. It ****ed to the LS-AS culture medium containing μ M AgNO₃. After cultivating for three days 25 degrees C and under dark, some unripe germs were extracted and the manifestation [transient GUS gene] was investigated by X-gluc. About the unripe germ which inoculated LBA4404 (pSB131) and LBA4404 (pNB131), it is after cocultivation, phosphino SURISHIN (PPT), and 10. μ M It cultivated by the culture medium containing AgNO₃, and the transformed cell was selected. The callus increased on the selection culture medium was ****ed to the redifferentiation culture medium containing PPT, and transformation vegetation was redifferentiated. Some leaves of the vegetation which redifferentiated were cut off and GUS gene expression was investigated by X-gluc like the example 1. In addition, an above-mentioned culture medium and cultivation followed the approach given in Ishida et al. 1996 (bibliography (20)). pSB131 and pTOK233 are the high super binary vectors of transformation capacity.

[0048] It is 1 at 46 degrees C. The result of a transient GUS gene [when inoculating LBA4404 (pSB131) into the unripe germ processed for 10 minutes] manifestation is shown in Table 7. GUS gene expression was accepted by all the unripe germs with which the trial was presented including non-processed contrast. However, the manifestation part was strongly seen, when it heat-treated compared with contrast. When it heat-treated more than for 3 minutes especially, many things which show GUS gene expression by the part where the scutellum front face of an unripe germ is large were seen. The result of a transient GUS gene [when inoculating the various strain of *Agrobacterium*] manifestation is shown in Table 8. By the heat-treated unripe germ, even when which strain was inoculated, all the unripe germs showed GUS gene expression. On the other hand, the non-processed unripe germ showed the weak manifestation compared with the case where any strain is heat-treated. When LBA4404 (pIG121Hm) and LBA4404 which are the usual binary vector which does not have the gene of strong virulence especially (pNB131) were inoculated, almost all unripe germs did not show GUS gene expression at all.

[0049] The transformation result in the A188 unripe germ which inoculated LBA4404 (pSB131) which is a super binary vector is shown in Table 9. Transformation vegetation was obtained from the unripe germ of the contrast which has not been heat-treated at 10.7% of effectiveness. On the other hand, in the unripe germ which performed 46 degrees C and heat treatment for 3 minutes, transformation effectiveness is 20% and its effectiveness improved non-processed twice [about]. The transformation result in the A188 unripe germ which inoculated LBA4404 (pNB131) which is the usual binary vector without the gene of strong virulence is shown in Table 4. Transformation vegetation was not obtained from the unripe germ of the contrast which has not been heat-treated. On the other hand, the independent transformation vegetation of two individuals was obtained in the unripe germ which performed 46 degrees C and heat treatment for 5 minutes. Transformation effectiveness was 2.4%.

[0050] When a super binary vector was used from the above result, it became clear by heat-treating, before inoculating the unripe germ of an ingredient that transgenics effectiveness increases compared with a conventional method, and transformation effectiveness also improves. Furthermore, by corn, transformation vegetation was obtained for the first time until now by heat-treating also in the usual binary vector without the example of a success. Possibility that transformation vegetation would be obtained from these things by heat-treating also about corn forms other than A188 which were not able to carry out a transformation by the conventional Agrobacterium method (Ishida et al.1996 (bibliography (20))) was suggested.

[0051]

[Table 7] Table 7 Effect affect transgenics effectiveness of heat treatment time amount (LBA4404 (pSB131) is inoculated)

It is [0052] as a result of a manifestation [transient GUS gene / in the unripe germ after cocultivation].

[Table 8] Table 8 Effect affect transgenics effectiveness of heat treatment

It is [0053] as a result of a manifestation [transient GUS gene / in the unripe germ after cocultivation].

[Table 9] Table 9 Effect affect transformation effectiveness of heat treatment (LBA4404 (pSB131) is introduced)

No numbers of calluses and numbers of vegetation contain a clone.

[0054]

[Table 10] Table 10 Effect affect transformation effectiveness of heat treatment (LBA4404 (pNB131) is introduced)

No numbers of calluses and numbers of vegetation contain a clone. The transient manifestation extracted and investigated some calluses after cocultivation.

[0055] MS mineral salt after sterilizing the full ripeness seed of example 3 creeping bentgrass (*Agrostis palustris* cv. Pencross and Snow Brand Seed, Inc.), MS vitamin, 4 mg/l dicamba, 0.5 mg/l 6BA, a 0.7 g/l proline, 0.5 g/l MES, and 20 g/l It ****ed to cane sugar and the culture medium (TG2 culture medium) containing 3 g/l gelrite (pH5.8), and cultivated 25 degrees C and under dark. the culture medium of this presentation of the guided callus -- subculture -- carrying out -- Embryo OJIE -- the nick callus was increased. After a passage, 2 Callus about 0.3g for the 3rd week was put into the tube of 2 ml containing a TG2L culture medium. After washing once by this liquid medium, liquid-medium 2 ml was newly added. The tube was immersed in the 46-degree C water bath for 5 minutes. Contrast was put between coincidence at the room temperature. the TG2-inf culture medium (the proline from TG2 culture medium --) which contains the ASETOSHI phosphorus gon of 100microM except for a culture medium MES and gelrite -- removing -- 48.46 g/l cane sugar and 36.04 g/l a glucose -- addition (pH 5.2) -- about -- by 1×10^9 cfu/ml concentration Liquid 1.0 ml which suspended LBA4404 (pTOK233) (Hiei et al., 1994 (bibliography (13))) was added, and it stirred with the vortex mixer for 30 seconds. They are 10 g/l glucose, 100microM ASETOSHI phosphorus gon, and 4 g/l to a TGafter putting at room temperature for 5 minutes 2L culture medium. Type I agarose (pH5.8) It ****ed to the added culture medium (TG2-AS culture medium). After cultivating for three days 25 degrees C and under dark, some calluses were extracted and the manifestation [transient GUS gene] was investigated by X-gluc like the example 1.

[0056] A manifestation [transient GUS gene / in the callus which inoculated LBA4404 (pTOK233)] is shown in Table 11. At the callus of the contrast which has not been heat-treated, when it heat-treated to a manifestation not having been shown at all, the manifestation [transient GUS gene] was accepted by 25% of callus.

[0057] The transformation of the lawn grass reported until now is based on the direct introducing method by party Kurgan (Zhong et al.1993 (bibliography (44)), Hartman et al.1994 (bibliography (12)), and Xiao and Ha 1997 (bibliography (42))) or erection ROPORESHON (Asano and Ugaki 1994 (bibliography (3)), Asano et al.1998 (bibliography (4))), and the example of a success of the transformation by *Agrobacterium* is not seen. As it saw also in this example, when the lowness of the effectiveness of the transgenics by the conventional method was the cause which makes difficult the transformation of the lawn grass by the *Agrobacterium* method, possibility that transformation vegetation would be obtained was shown by heat treatment of the invention in this application by which transgenics is made by high frequency.

[0058]

[Table 11] Table 11 Heredity installation result to lawn grass callus (LBA4404 (pTOK233) is inoculated)

[0059] Example 4 (1) The suspension culture cell strain BY2 of a sample offering organization and the sample offering bacillus system tobacco form bright yellow No. 2 was used as a charge of a test specimen. The suspension culture cell was cultivated under 25-degree-C dark condition by LS liquid medium containing 0.2 mg/l 2 and 4-D, and was maintained by carrying out a passage weekly. LBA4404 (pTOK233) (Hiei et al., 1994 (bibliography (13))) was used for Agrobacterium and its vector.

[0060] (2) About 0.3 suspension culture cell g on the 4th was immersed in the tube containing the sterilized water of 1 ml after the heat treatment passage. the water bath which set the tube as 43 degrees C or 46 degrees C -- 10 minutes - it heat-treated by being immersed for 20 minutes. The contrast processing division was because it puts at a room temperature (25 degrees C). After heat treatment termination cooled the tube with the stream.

[0061] (3) Inoculation, inoculation of Agrobacterium to a cocultivation suspension culture cell, and cocultivation were carried out by the approach of Komari (1989) (bibliography (23)). After carrying out cocultivation for two days under 25-degree-C dark, the GUS gene expression investigation by X-Gluc processing was presented with the suspension culture cell like the example 1 by the approach of Hiei et al. (1994) (bibliography (13)).

[0062] (4) The result suspension culture cell was heat-treated, cocultivation with LBA4404 (pTOK233) was performed, and the result of having investigated the transient manifestation of a GUS gene was shown in Table 12. When it heat-treated compared with a non-processed division, the frequency of a cell which shows a GUS manifestation was clearly high, and was understood to be what transgenics produced by high frequency more. It was checked that heat treatment has the effectiveness of raising effectiveness not only in monocotyledonous plants, such as a rice, corn, and lawn grass, but in the transgenics to a dicotyledonous plant.

[0063]

[Table 12] Table 12 Transient manifestation of GUS gene in processing temperature and

suspension culture cell BY2

* +: -- low ++: -- a little high +++: -- high sample offering bacillus system: LBA4404 (pTOK233) and cocultivation period: -- two days [0064]

[Effect of the Invention] The method of raising the effectiveness of the transgenics to the plant cell which can perform transgenics simple, without ****(ing) an organization at effectiveness higher than the transgenics approach by the conventional *Agrobacterium* method by this invention was offered. The approach of this invention is applicable also to a dicotyledonous plant also to a monocotyledonous plant. Moreover, also in the vegetation which was not able to carry out a transformation, by the conventional *Agrobacterium* method, the transformation became possible by the approach of this invention like lawn grass.

[0065] Bibliography (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617 (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, and R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A3*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, and pp. 1-19. (3) Asano and Y., Ugaki and M. (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246. (4) Asano, Y., Ito, and Y., Fukami, M., and Sugiura, K., Fujiie, and A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:963-967. (5) Bevan and M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12 and 8711-8721. (6) Bidney, D., Scelonge, C., and Martich, J., Burrus, M., and Sims, L. and and Huffmanm G. Microprojectile (1992) bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18, and 301-313 (7) Chan, M-T., Cheng, and H-H., Ho, S-L., Tong, and W-F. and Yu and S-M. (1993) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. (8) Chilton and M-D., Currier, TC., and Farrand, SK., Bendich, AJ., and Gordonm MP. & Nester and EW. (1974) *Agrobacterium tumefaciens*

DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676. (9) Ditta, G., Stanfield, S., and Corbin, D. and Helinski and D.R. Broadhost range (1980) DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, and 7347-7351. (10) Fraley, R.T., and Rogers, S. G., Horsch, and R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, and 629-635. (11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, and J.S., Adams, S.P., and Bittner, M. L., Brand, L.A., and Fink, C. L., Fry, J.S., and Galluppi, G. R., Goldberg, and S.B., Hoffmann and N.L. and Woo, S. C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, and 4803-4807. (12) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Tumer, N.E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12:919-923. (13) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6 and 271-282. (14) Hoekema, A., Hirsch, P.R., and Hooykaas, P. J.J. and Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, and 179-180. (15) Hood, E.E., and Fraley, R. T. and Chilton and M.-D. Virulence of (1987) *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiol*, 83, and 529-534. (16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, and A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* and 2, 208-218. (17) Hood and E.E., Helmer, G.L., and Fraley, R. T. and Chilton and M.-D. The hypervirulence (1986) of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168 and 1291-1301. (18) Hood, E.E., Jen, and G., Kayes, L., Kramer, and J., Fraley and R.T. and Chilton, M. -D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542 and a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/technology*, 2 and 702-709. (19) Horsch and R. B., Fry, J.E., and Hoffmann, N.L., Eichholtz, and D., Rogers and S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231. (20) Ishida, Y., Saito, H., and Ohta, S., Hiei, Y., and Komari, T. and Kumashiro and T. High efficiency (1996) transformation of maize mediated (*Zea mays* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol*, 14, and 745-750. (21) Jefferson and R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5 and 387-405. (22) Jin, S., Komari, T., and Gordon, M. P. and Nester and E.W. Genes responsible (1987) for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol.*, 169, and

4417-4425. (23) Komari and T.(1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Sci.*, 60, and 223-229. (24) Komari and T.Genetic (1990a) characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment.*Theor.Appl.Genet.*, 80, 1 67-171.(25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.(26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. Physical and (1986) functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542.*J.Bacteriol.*, 166 and 88-94. (27) Komari, T., Hiei, Y., and Saito, Y., Murai, and N.and Kumashiro, T.Vectors carrying (1996) two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, 10, and 165-174. (28) Komari and T.and Kubo, T.(1999) Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil and I.K. (ed.) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht and pp.43-82. (29) Li, H.-Q., and Sautter, C., Potrykus, and I.and Puonti-Kaerlas and J.Genetic transformation of cassava (1996).(*Manihot esculenta* Crantz) *Nature Biotechnol.*, 14 and 736-740. (30) Lindsey, K., Gallois, and P.and Eady and C.(1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*.*Plant Tissue Culture Manual B7:1-13*. Kluwer Academic Publishers. (31) McCormick and S.(1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual B6:1-9*. Kluwer Academic Publishers. (32) Murashige and T.and Skoog, F.(1962) *Physiol.Plant* 15:473-497. (33) Ohta, S., Mita, S., and Hattori, T., Nakamura, and K. (1990). Construction and expression in tobacco of a beta-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence.*Plant Cell Physiol.*31:805-813. (34) Potrykus I., Harms, C.T.and Lorz, and H.(1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn .*Theor. (Zea mays L.) Appl.Genet.*54:209-214. (35) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., and Sautter, C.and Schrott and M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, NY:Mercel Dekker Inc. pp.119-159. (36) Rogers, S. G., Horsch, and R.B.and Fraley and R.T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors.*Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc.pp.423-436. (37) Saito, Y., Komari, T., M asuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.(38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Sci.*, 41:179-183.(39) Trick, H.N.and Finer, and J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation.*Transgenic Research* 6:329-336. (40) Visser

and R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B5:1-9. Kluwer Academic Publishers. (41) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. Plasmid required (1975) for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 123, and 255-264. (42) Xiao, L., Ha, and S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. Plant Cell reports 16:874-878. (43) Zambryski, P., Joos, H., and Genetello, C., Leemans, J., and Van Montagu and M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J and 2, 2143-2150. (44) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, and M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-342255
(P2000-342255A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000. 12. 12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00	A 4 B 0 2 4

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平11-158024

(22) 出願日 平成11年6月4日 (1999. 6. 4)

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72) 発明者 樋江井 祐弘

静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た
ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

(72) 発明者 笠岡 啓介

静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た
ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

(74) 代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) 【要約】

【課題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。

【解決手段】 植物細胞又は植物組織を熱処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物細胞又は植物組織を熱処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。

【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 熱処理が33℃～60℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 熱処理が35℃～55℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。

【請求項5】 熱処理が37℃～52℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。

【請求項6】 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。

【請求項8】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植物由来である請求項8記載の方法。

【請求項10】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項9記載の方法。

【請求項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ、シバ及びタバコから成る群より選ばれる植物由来である請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

【0003】このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である(Potrykus et al. 1998(参考文献(35)))。すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得るこ

とができる作物の種類は、現状では一部に限定されている。したがって、このような問題点を解決することができる改良手法の開発が強く望まれている。

【0004】アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織に対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる(Rogers et al. 1988(参考文献(36))), Visser 1991(参考文献(40)), McCormick 1991(参考文献(31)), Lindsey et al. 1991(参考文献(30)))。従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの菌系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

【0005】これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理的状态に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的状态に変換することができれば利用価値が高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992(参考文献(6)))および超音波(Trick et al., 1997(参考文献(39)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付傷することでバクテリアの植物組織内への侵入を促し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリーフディスク法(Horsch et al., 1985(参考文献(19)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組

織を熱処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子を導入する植物細胞又は植物組織を熱処理することを伴う。植物細胞又は植物組織は、熱処理し、常温まで冷却した後、アグロバクテリウム属細菌と接触させる方法であってもよいし、熱処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法であってもよい。また、熱処理し、常温まで冷却した後、熱処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法であってもよい。これらの方法のうち、好ましい方法としては、熱処理し、常温まで冷却した後、アグロバクテリウム属細菌と接触させる方法を挙げることができる。

【0010】熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理する細胞又は組織の量等に応じて適宜選択されるが、通常、33℃～60℃、好ましくは35℃～55℃、さらに好ましくは37℃～52℃程度の温度範囲で行われる。また、熱処理の時間は、熱処理温度、用いる植物の種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜選択されるが、通常5秒間～24時間程度である。なお、熱処理時間は、熱処理温度が高い場合には短くても遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。例えば、熱処理温度が60℃の場合には5秒間程度の熱処理時間でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる場合がある。一方、熱処理温度が34℃程度の低温の場合には、数十時間の熱処理により遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい熱処理条件は、37℃～52℃で1分間～24時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織にとっての適切な熱処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。なお、植物細胞又は植物組織を55℃以上の温度で長時間にわたって熱処理すると、植物細胞がダメージを受け、形質転換効率が低下する場合があるので、熱処理温度が55℃以上の場合には、熱処理時間を短くし、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に設定して植物細胞がダメージを受けないようにすることが好ましい。

【0011】本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理したものを用いる、又は熱処理を行いながらアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

【0012】アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

【0013】土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (Crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン (サイトカイニンとオーキシシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域 (vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* も Ri プラスミドによる同様なシステムを有している (図3及び図4)。

【0014】アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

【0015】まず、腫瘍性のTiプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 (disarmed strains) であるLBA4404 (Hoekema et al., 1983 (参考文献(14))), C58C1 (pGV3850) (Zambryski et al., 1983 (参考文献(43))), GV3Ti11SE (Fraley et al., 1985 (参考文献(10))) などが作製された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型TiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ditta et al., 1980 (参考文献(9))) を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fraley et al., 1985 (参考文献(10))); Fraley et al., 1983 (参考文献(11))); Zambryski et al., 1983 (参考文献(43)))、特開昭59-140885号 (EP116718))。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図3)、T-DNAの植物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果 (Hoekema et al., 1983 (参考文献(14))) に基づいている。このvir領域にはvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989)))、vi

r領域とはこのvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19(Bevan, 1984(参考文献(5))), pBI121(Jefferson, 1987(参考文献(21))), pGA482(An et al., 1988(参考文献(2))), 特開昭60-70080号(EP120516))などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Riプラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

【0016】アグロバクテリウムA281(Watson et al., 1975(参考文献(41)))は、強病原性(super-virulent)の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い(Hood et al., 1987(参考文献(15))); Komari, 1989(参考文献(23)))。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTiBo542によるものである(Hood et al., 1984(参考文献(18))); Jin et al., 1987(参考文献(22))); Komari et al., 1986(参考文献(26)))。

【0017】pTiBo542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のディスアーム型のTiプラスミドを有する菌系EHA101(Hood et al., 1986(参考文献(17)))およびEHA105(Hood et al., 1993(参考文献(16)))を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター('super-binary' vector)(Hiei et al., 1994(参考文献(13))); Ishida et al., 1996(参考文献(20))); Komari et al., 1999(参考文献(28)), W094/00977号、W095/06722号)システムである(図4)。このシステムは、vir領域(virA, virB, virC, virD, virE及びvirG(以下、これらをそれぞれ「vir断片領域」ということもある。))を持つディスアーム型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir断片領域のうち、少なくとも一つのvir断片領域を実質的に取除いたvir領域の断片(このうち好ましくは少なくともvirB又はvirGを含む断片、さらに好ましくはvirB及びvirGを含む断片)を組み込んだ(Komari, 1990a(参考文献(24)))スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換

えが容易な手法として利用できる(Komari et al., 1996(参考文献(27)))。このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている(Hiei et al., 1994(参考文献(13))); Ishida et al., 1996(参考文献(20))); Komari, 1990b(参考文献(25))); Li et al.(参考文献(29)), 1996; Saito et al., 1992(参考文献(37)))。

【0018】本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens* (例えば上述の*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(Hoekema et al., 1983(参考文献(14)))およびEHA101(Hood et al., 1986(参考文献(17)))を好ましく用いることができる。

【0019】本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性(vir)領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されことなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である(例えば、アグロバクテリウム属細菌のvir領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

【0020】植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的のDNAを導入することができる。

【0021】また、プラスミドを*Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

【0022】植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配

置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

【0023】アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物細胞又は植物組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

【0024】遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何ら限定されるものではなく、葉、根、茎、実、その他いずれの部位であってもよいし、カルスのような脱分化したものであってもよい。また、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ましく、被子植物ならば双子葉植物でも単子葉植物でもよい。

【0025】下記実施例において具体的に示されるように、本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム法に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。また、従来からアグロバクテリウム法により遺伝子導入が可能であった植物の遺伝子導入効率が向上するだけではなく、従来のアグロバクテリウム法によっては遺伝子導入することができなかった植物に対しても本発明の方法により遺伝子導入が初めて可能になった。従って、本発明における「遺伝子導入の効率の向上」には、従来の方法では遺伝子導入が不可能であったものを可能にすることも包含される（すなわち、従来0%であった遺伝子導入効率を向上させたと考える）。

【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0027】実施例1

(1) 供試組織および供試菌系

ジャポニカイネの朝の光およびインディカイネのIR72を供試品種とし、未熟胚および未熟胚由来のカルスを材料として用いた。供試未熟胚は、開花後1～2週間の未熟種子から採取し、Hiei et al., 1994(参考文献(13))の方法により調製した。すなわち、開花後、7～12日目の未熟種子を穎を除去した後、70% エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬することにより消毒した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。また、未熟胚由来カルスは、未熟胚を4g/l Gelriteを含む2N6培地(Hiei et al. 1994(参考文献(13)))上で2週間培

養することにより得た。

【0028】アグロバクテリウムの菌系及びプラスミドベクターとして、LBA4404(pIG121Hm)(Hiei et al., 1994(参考文献(13)))、LBA4404(pNB131)(図2参照)、LBA4404(pTOK233)(Hiei et al., 1994(参考文献(13)))を用いた。

【0029】pNB131の構築は、以下のように行った。pSB31(Ishida et al., 1996(参考文献(20)))を大腸菌LE392株に導入した後、Triparental mating法(Ditta et al., 1980(参考文献(9)))により、pNB1(Komari et al., 1996(参考文献(27)))を有するアグロバクテリウムLBA4404株に導入した。アグロバクテリウム内でpNB1とpSB31の間の相同組換えによりpNB131を得た。

【0030】pIG121HmのT-DNA領域には、ノバリン合成酵素(nos)遺伝子のプロモーターにより制御されるカナマイシン耐性(nptII)遺伝子、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターにより制御されるハイグロマイシン耐性(hpt)遺伝子、35Sプロモーターにより制御されヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するGUS遺伝子(Ohta et al., 1990(参考文献(33)))を有する。

【0031】pNB131のT-DNA領域には、35Sプロモーターにより制御されるbar遺伝子、35Sプロモーターにより制御されイントロンが介在するGUS遺伝子(上述)を有する。

【0032】pTOK233のT-DNA領域には、nosプロモーターにより制御されるnptII遺伝子、35Sプロモーターにより制御されるhpt遺伝子、35Sプロモーターにより制御されイントロンが介在するGUS遺伝子(上述)を有する。pTOK233は形質転換能力が高いスーパーバイナリーベクター(Komari et al., 1999(参考文献(28)))である。

【0033】(2) 熱処理

供試組織(5～200 mg)を1 mlの滅菌水の入ったチューブに浸漬した。チューブを各処理温度に設定したウォーターバスに1分～数十時間浸漬することにより熱処理を行った。対照処理区は、室温(25℃)で静置することによった。熱処理終了後、チューブを流水で冷却した。

【0034】(3) 接種および共存培養

熱処理後、チューブ内部の滅菌水を除き、アグロバクテリウムの懸濁液を加え、5～30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。バクテリア懸濁液の調製はHiei et al. (1994) ((参考文献(13)))によった。すなわち、A B培地(Chilton M-D et al., 1974(参考文献(8)))上で3～10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正A A培地(A A主要無機塩類、A Aアミノ酸及びA Aビタミン類(Toriyama K, 1985(参考文献(38)))、M S微量塩類(Murashige T., 1962(参考文献(32)))、1.0 g/l カザミノ酸、100 μMアセトシリノン、0.2 M ショ糖、0.2 M グルコース)に懸

濁した。また、懸濁液の菌密度は、約 $0.3 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mlに調整した。約5分間室温で静置した後、共存培養用の培地に置床した。未熟胚の共存培養の培地には、8 g/l アガロスを培地固化剤とした2N6-AS (Hiei et al. 1994(参考文献(13)))を用いた。カルスの共存培養の培地には、4 g/l Gelriteを含む2N6-AS (Hiei et al. 1994(参考文献(13)))を用いた。25℃、暗黒下で3～7日間共存培養した後、未熟胚またはカルスの一部を、Hieiら(1994)(参考文献(13))の方法によりX-Gluc処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100を含む0.1 M リン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸(X-gluc)および20% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察した。

【0035】(4) 日本稲における形質転換細胞の選抜共存培養後、未熟胚については肥大生長した胚盤部位をメスにより4～7分割した後、カルスについては分割は行わずに、選抜薬剤を含まない2N6培地(上述)で数日間30℃明条件下で培養した。次に、50～100 mg/lハイグロマイシン、200mg/l パロモマイシンのいずれかを含む2N6培地上に移植し、30℃明条件下で約2～3週間培養した。なお、10mg/l フォスフィノスリシン(PPT)を選抜薬剤に含む培地には、2 mg/lの2,4-Dを含みココナツ水を除いたCC培地(Potrykus et al. 1979(参考文献(34)))を用いた。培地上に形成された薬剤耐性カルスを、それぞれ同濃度の選抜薬剤を含むN6-7培地(Hiei et al. 1994(参考文献(13)))に移植し、7日間30℃明条件下で2次選抜を行った。各培地には250 mg/l セフォタキシムと250 mg/l カルベニシリン二ナトリウムを組み合わせもしくは250 mg/l セフォタキシムを単独で添加した。また培地固化剤には、4g/l Gelriteを用いた。培地上で増殖した薬剤耐性カルスに X-Gluc処理を行い、GUS遺伝子の発現を調査した。

【0036】(5) 結果
各種処理温度で未熟胚を10分間処理し、LBA4404(pTOK233)との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を調査した結果を表1および表2に示した。無処理区に比べ46℃前後の熱処理をした場合に、胚盤におけるGUS発現領域は明らかに広く、より高頻度で遺伝子導入が生じたものと理解された。一方、52℃以上の熱処理は植物組織にダメージを与えることがあり、55℃処理では未熟胚の生長を抑制し、GUS発現も観察されなかった。10分間の短時間処理では、43℃試験区における明瞭なGUS発現領域の拡大は認められなかった。

【0037】イネ未熟胚とアグロバクテリウムを共存培養した後、選抜薬剤を含む培地上で培養して得られた形質転換カルスの選抜結果を表3および表4に示した。LB

A4404(pIG121Hm)を接種した試験では、熱処理していない未熟胚の分割切片からは、12.0%の効率でハイグロマイシン耐性かつ一様なGUS遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られた(表4)。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚の分割切片では、形質転換カルスが29%の効率で得られた(表3)。また、パロモマイシンによる選抜では、熱処理していない未熟胚の切片からは、2.0%の低効率で形質転換カルスが得られたのに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚切片では、12.0%の効率で得られた(表4)。LBA4404(pNB131)を接種した試験では、熱処理していない未熟胚の切片からは、29.0%の効率でPPT耐性かつ一様なGUS遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られた(表5)。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚の切片では、形質転換カルスが50.0%の効率で得られた(表5)。いずれも未熟胚への熱処理により、顕著な形質転換効率の向上が認められた。

【0038】イネ未熟胚由来カルスとアグロバクテリウムLBA4404(pTOK233)を共存培養した後、ハイグロマイシンを含む培地上で培養して得られた形質転換カルスの選抜結果を表6に示した。熱処理していないカルスからは、24.1%の効率でハイグロマイシン耐性かつ一様なGUS遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られた(表6)。これに対し、46℃、3分もしくは10分間の熱処理を行ったカルスでは、形質転換カルスが36.2～36.9%の効率で得られた(表6)。以上のように、イネカルスへの熱処理においても、顕著な形質転換効率の向上が認められた。

【0039】未熟胚およびカルスを用いて、共存培養後のGUS発現を指標に処理温度と処理時間の関係についてさらに検討を加えたところ、より高温の場合には短時間の処理が、比較的低い温度の場合には長時間の処理が、遺伝子導入の効率を高めた。すなわち、60℃の熱処理区では数秒の処理により、35℃では数時間から数十時間の処理により、遺伝子導入効率を向上させる明瞭な効果が認められた。

【0040】Hiei et al. (1994)(参考文献(13))は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転換が行うことができることを報告している。また、Aldemita RR. et al., 1996(参考文献(1))は、イネの未熟胚を用いた形質転換例を報告している。これらの形質転換手法をより効率よく安定して実施するために、上述した熱処理法は非常に有効である。特に、未熟胚は栽培環境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、熱処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (1994)(参考文献(13))は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Aldemita and Hodges (1996)(参考文献(1))によれば、スー

パーバイナリーベクターのLBA4404(pTOK233)を用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研究における熱処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーバイナリーベクターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパーバイナリーベクターと熱処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能であ

る。さらに、熱処理法を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができるものと推察される。

【0041】

【表1】表1 処理温度と未熟胚胚盤におけるGUS遺伝子の一過性発現（品種：IR72）

処理温度	供試未熟胚数	未熟胚数						
		胚盤表面における GUS 発現領域の割合 (%)						
		0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100
無処理 (室温)	20	1	6	12	1	0	0	0
43℃	20	1	5	12	2	0	0	0
46℃	20	0	0	3	3	7	6	1

供試菌系：LBA4404(pTOK233)，熱処理時間：10分，共存培養期間：4日
【0042】

【表2】表2 処理温度と未熟胚胚盤におけるGUS遺伝子の一過性発現（品種：朝の光）

処理温度	供試未熟胚数	未熟胚数						
		胚盤表面における GUS 発現領域の割合 (%)						
		0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100
無処理 (室温)	20	0	2	13	3	2	0	0
43℃	20	0	1	9	2	7	1	0
46℃	20	0	0	1	3	9	6	1
49℃	20	0	1	8	5	6	0	0
52℃	20	3	4	4	2	6	1	0
55℃	20	0	0	0	0	0	0	0

供試菌系：LBA4404(pTOK233)，熱処理時間：10分，共存培養期間：3日
【0043】

【表3】表3 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選抜効率（品種：朝の光）

処理	供試未熟胚切片数 (A)	Hm耐性GUS陽性カルス数 (B)	B/A (%)
無処理 (室温)	50	6	12.0
46℃ 5分	51	15	29.4

供試菌系：LBA4404(pIG121Hm)，共存培養期間：5日，Hm：ハイグロマイシン
【0044】

【表4】表4 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選抜効率（品種：朝の光）

処理	供試未熟胚 切片数 (A)	Pm耐性GUS陽性 カルス数 (B)	B/A (%)
無処理 (室温)	50	1	2.0
46℃ 5分	50	6	12.0

供試菌系：LBA4404(pIG121Hm)，共存培養期間：5日，
m：パロモマイシン
【0045】

【表5】表5 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選
抜効率（品種：朝の光）

処理	供試未熟胚 切片数 (A)	PPT耐性GUS陽性 カルス数 (B)	B/A (%)
無処理 (室温)	62	18	29.0
46℃ 5分	64	32	50.0

供試菌系：LBA4404(pNB131)，共存培養期間：6日
【0046】

【表6】表6 カルスへの熱処理と形質転換カルスの選
抜効率（品種：朝の光）

処理	供試カルス 数 (A)	Hm耐性GUS陽性 カルス数 (B)	B/A (%)
無処理 (室温)	133	32	24.1
46℃ 3分	111	41	36.9
46℃ 10分	105	38	36.2

供試菌系：LBA4404(pTOK233)，共存培養期間：3日
【0047】**実施例2**
大きさ約1.2 mmのトウモロコシ未熟胚（品種A188、農林水産省生物資源研究所より入手）を無菌的に取り出し、LS-inf液体培地を含む2 mlのチューブに入れた。同液体培地で一回洗浄した後、新たに同液体培地2.0 mlを加えた。46℃のウォーターバスにチューブを1 - 10分間浸漬した。対照は、室温で同時間静置した。培地を除き、100 mMのアセトシリンゴンを含むLS-inf液体培地に約 1×10^9 cfu/mlの濃度で、Agrobacterium tumefaciens LBA4404(pIG121Hm)、EHA101(pIG121Hm)、LBA4404(pTOK233)（以上、Hiei et al., 1994(参考文献(13))に記載）、LBA4404(pSB131)（Ishida et al., 1996(参考文献(20))）またはLBA4404(pNB131)（実施例1及び図2に記載）を懸濁した液1.0 mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5分間室温で静置した後、胚軸面が培地に接するように10 μ M AgNO₃を含むLS-AS培地に置床した。25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部の未熟胚を採取し、X-glucによりGUS遺伝子のトランジェントな発現を調査した。LBA4404(pSB131)及びLBA4404(pNB131)を接種した未熟胚については、共存培養後、フォスフィノスリシン(PPT)及び10 μ M AgNO₃を含む培地で培養し、形質転換細胞の選抜を行った。選抜培地上で増殖し

たカルスをPPTを含む再分化培地に置床し、形質転換植物の再分化を行った。再分化した植物の葉の一部を切り取り、実施例1と同様にしてX-glucによりGUS遺伝子の発現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida et al. 1996（参考文献(20)）に記載の方法に従った。pSB131とpTOK233は形質転換能力の高いスーパーバイナリーベクターである。

【0048】46℃で1 - 10分間処理した未熟胚にLBA4404(pSB131)を接種したときのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果を表7に示す。無処理の対照を含め試験に供した全ての未熟胚でGUS遺伝子の発現が認められた。しかし、その発現部位は対照に比べ熱処理した場合に強く見られた。特に3分以上熱処理した場合には、未熟胚の胚盤表面の広い部位でGUS遺伝子の発現を示すものが多く見られた。アグロバクテリウムの種々の菌株を接種したときのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果を表8に示す。熱処理した未熟胚ではいずれの菌株を接種した場合でも、全ての未熟胚がGUS遺伝子の発現を示した。これに対し、無処理の未熟胚では、いずれの菌株でも熱処理した場合に比べ弱い発現を示した。特に強病原性の遺伝子をもたない通常のバイナリーベクターであるLBA4404(pIG121Hm)およびLBA4404(pNB131)を接種した場合には、ほとんどの未熟胚がGUS遺伝子の発現を全く

示さなかった。

【0049】スーパーバイナリーベクターであるLBA4404(pSB131)を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表9に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、10.7%の効率で形質転換植物が得られた。これに対し、46℃、3分間の熱処理を行った未熟胚では、形質転換効率は20%で、無処理の約2倍に効率が向上した。強病原性の遺伝子をもたない通常のバイナリーベクターであるLBA4404(pNB131)を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表4に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、形質転換植物は得られなかった。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚では、2個体の独立な形質転換植物が得られた。形質転換効率は2.4%であった。

【0050】以上の結果から、スーパーバイナリーベクターを用いた場合、材料の未熟胚を接種前に熱処理することにより、従来法に比べ遺伝子導入効率が増大し、また、形質転換効率も向上することが明らかとなった。さらに、今までにトウモロコシでは成功例のない通常のバイナリーベクターにおいても熱処理することにより初めて形質転換植物が得られた。これらのことから、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以

外のトウモロコシ品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(20))) についても熱処理することにより形質転換植物の得られる可能性が示唆された。

【0051】

【表7】表7 熱処理時間の遺伝子導入効率に及ぼす影響 (LBA4404(pSB131)を接種)

46℃処理 時間(min)	供試 未熟胚	G U S			
		+++	++	+	-
0	19	0	1	18	0
1	20	0	2	18	0
3	20	2	5	13	0
5	20	1	5	14	0
10	20	5	3	12	0

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果

【0052】

【表8】表8 熱処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響

接種菌株	処理	供試 未熟胚	G U S			
			+++	++	+	-
LBA4404 (pIG121Hm)	46℃ 5 min	12	0	3	9	0
	無処理	12	0	1	2	9
EHA101 (pIG121Hm)	46℃ 5 min	14	2	9	3	0
	無処理	13	0	3	9	1
LBA4404 (pTOK233)	46℃ 5 min	15	9	6	0	0
	無処理	16	0	6	10	0
LBA4404 (pNB131)	46℃ 5 min	15	0	2	13	0
	無処理	15	0	0	2	13

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果

【0053】

【表9】表9 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LBA4404(pSB131)を導入)

処理	供試 未熟胚数	PPT 耐性 カルス (%)	PPT 耐性 植物 (%)	GUS+ 植物 (%)
46℃ 3 min	30	18 (60.0)	15 (50.0)	6 (20.0)
無処理	28	9 (32.1)	9 (32.1)	3 (10.7)

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。

【0054】

【表10】表10 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LBA4404(pNB131)を導入)

処理	供試 未熟種子数	トランジェン トGUS+ %	PPT 耐性 カルス (%)	PPT 耐性 植物 (%)	GUS+ 植物 (%)
46℃ 5 min	84	71.4	7 (8.3)	2 (2.4)	2 (2.4)
無処理	20	0	0	0	0

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。トランジェント発現は、共存培養後一部のカルスを採取して調査した。

【0055】実施例3

クリーピングベントグラス (*Agrostis palustris* cv. P encross、雪印種苗(株))の完熟種子を滅菌後、MS無機塩、MSビタミン、4 mg/l dicamba、0.5 mg/l 6BA、0.7 g/l プロリン、0.5 g/l MES、20 g/l ショ糖、3 g/l gelrite (pH5.8)を含む培地 (TG2培地) に置床し、25℃、暗黒下で培養した。誘導されたカルスを同組成の培地で継代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖した。継代後、2-3週間目のカルス約0.3gをTG2L培地を含む2 mlのチューブに入れた。同液体培地で一回洗浄した後、新たに液体培地2 mlを加えた。46℃のウォーターバスにチューブを5分間浸漬した。対照は、室温で同時間静置した。培地を除き、100 μMのアセトシリゴンを含むTG2-inf培地 (TG2培地からプロリン、MES、gelriteを除き、48.46 g/l ショ糖、36.04 g/l グルコースを添加(pH 5.2)) に約 1×10^9 cfu/mlの濃度で、LBA4404(pTOK233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(13))) を懸濁した液1.0 mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5分間室温で静置した後、TG2L培地に10 g/l グルコース、100 μM アセトシリゴン、4 g/l タイプI アガロース (pH5.8) を添加した培地 (TG2-AS培地) に置床した。25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部のカルスを採取し、実施例1と同様にしてX-glucによりGUS遺伝子のトランジェントな発現を調査した。

【0056】LBA4404(pTOK233)を接種したカルスでのGUS遺伝子のトランジェントな発現を表11に示す。熱処理していない対照のカルスでは、全く発現を示さなかったのに対し、熱処理した場合、25%のカルスでGUS遺伝子のトランジェントな発現が認められた。

【0057】今までに報告されているシバの形質転換はパーティクルガン (Zhong et al. 1993(参考文献(44))), Hartman et al. 1994(参考文献(12))), Xiao and Ha 1997(参考文献(42))) やエレクトロポレーション (Asano and Ugaki 1994(参考文献(3))), Asano et al. 1998(参考文献(4))) による直接導入法によるもので、アグロバクテリウムによる形質転換の成功例はみられない。本実施例でもみられたように、従来法による遺伝子導入の効率の低さが、アグロバクテリウム法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、高頻度で遺伝子導入のなされる本願発明の熱処理により、形質転換植物

の得られる可能性が示された。

【0058】

【表11】表11 シバカルスへの遺伝導入結果 (LBA4404(pTOK233)を接種)

処理	供試 カルス	GUS+ カルス (%)
46℃ 5 min	20	5 (25.0)
無処理	20	0

【0059】実施例4

(1) 供試組織および供試菌系

タバコ品種ブライトイエロー2号の懸濁培養細胞株BY2を供試材料として用いた。懸濁培養細胞は0.2mg/l 2,4-Dを含むLS液体培地で25℃暗条件下で培養し、1週間毎に継代することにより維持した。アグロバクテリウムおよびそのベクターには、LBA4404(pTOK233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(13))) を用いた。

【0060】(2) 熱処理

継代後4日目の懸濁培養細胞約0.3gを1 mlの滅菌水の入ったチューブに浸漬した。チューブを43℃または46℃に設定したウォーターバスに10分～20分浸漬することにより熱処理を行った。対照処理区は、室温 (25℃) で静置することによった。熱処理終了後は、チューブを流水で冷却した。

【0061】(3) 接種および共存培養

懸濁培養細胞へのアグロバクテリウムの接種および共存培養は、Komari (1989) (参考文献(23))の方法により実施した。25℃暗黒下で2日間共存培養した後、懸濁培養細胞を、Hiei et al. (1994) (参考文献(13))の方法により実施例1と同様にしてX-Gluc処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。

【0062】(4) 結果

懸濁培養細胞を熱処理し、LBA4404(pTOK233)との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を調査した結果を表12に示した。無処理区に比べ熱処理をした場合に、GUS発現を示す細胞の頻度は明らかに高く、より高頻度で遺伝子導入が生じたものと理解された。熱処理は、イネ、トウモロコシおよびシバなどの単子葉植物だけではなく、双子葉植物への遺伝子導入にも効率を向上させる効果があることが確認された。

【0063】

【表12】表12 処理温度と懸濁培養細胞BY2におけ

るGUS遺伝子の一過性発現

処理温度	処理時間	GUS発現を示した細胞の頻度*
無処理 (室温)	—	+
43℃	10 分	++
43℃	20 分	+++
46℃	10 分	+++

* + : 低い, ++ : やや高い, +++ : 高い

供試菌系 : LBA4404(pTOK233), 共存培養期間 : 2日

【 0064 】

【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

【 0065 】参考文献

- (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) Asano, Y., Ugaki, M. (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
- (4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiura, K., Fujiie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:963-967.
- (5) Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- (6) Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., and Huffmanm G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313
- (7) Chan, M-T., Cheng, H-H., Ho, S-L., Tong, W-F. and Yu, S-M. (1993) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene.
- (8) Chilton, M-D., Currier, TC., Farrand, SK., Bendich, AJ., Gordonm MP.& Nester, EW. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676.
- (9) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.
- (11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M. L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.
- (12) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Tumer, N. E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12:919-923.
- (13) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- (14) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
- (15) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiol*, 83, 529-534.
- (16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.*, 2, 208-218.
- (17) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
- (18) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/technology*

chnology, 2, 702-709.

(19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rpgers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

(20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14, 745-750.

(21) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387-405.

(22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol.*, 169, 4417-4425.

(23) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Sci.*, 60, 223-229.

(24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.

(25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.

(26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1986) Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.

(27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, 10, 165-174.

(28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I.K. (ed.) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.

(29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puonti-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnol.*, 14, 736-740.

(30) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manu*

al B7:1-13. Kluwer Academic Publishers.

(31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* B6:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(32) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:473-497.

(33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K., (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31:805-813.

(34) Potrykus, I., Harms, C. T. and Lorz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.

(35) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, NY: Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.

(36) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp. 423-436.

(37) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.

(38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Sci.*, 41:179-183.

(39) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.

(40) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* B5:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(41) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.

(42) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. *Plant Cell reports* 16:874-878.

(43) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.

(44) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports* 13:1-6.

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpTOK233の構築方法を示す図である。

【図2】本発明の方法に好ましく用いることができるバイナリーベクターの例であるpNB131の遺伝子地図を示す図である。

【図3】アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベクターシステムである中間ベクターシステムとバイナリーベクターシステムの構築過程を示す模式図である。

【図4】アグロバクテリウム ツメファシエンズの強病原性菌株A281に由来する2種類のバイナリーベクターシステムを示す模式図である。

【符号の説明】

BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダー配列
BR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボーダー配列
TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

IG イントロンGUS遺伝子

HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素KpnI部位

H 制限酵素HindIII部位

Amp^r アンピシリン耐性遺伝子

BAR bar遺伝子

COS, cos ラムダファージのCOS部位

ORI, ori ColE1の複製開始点

P35S CaMV 35Sプロモーター

Tnos ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター

virB *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirB遺伝子

virC *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirC遺伝子

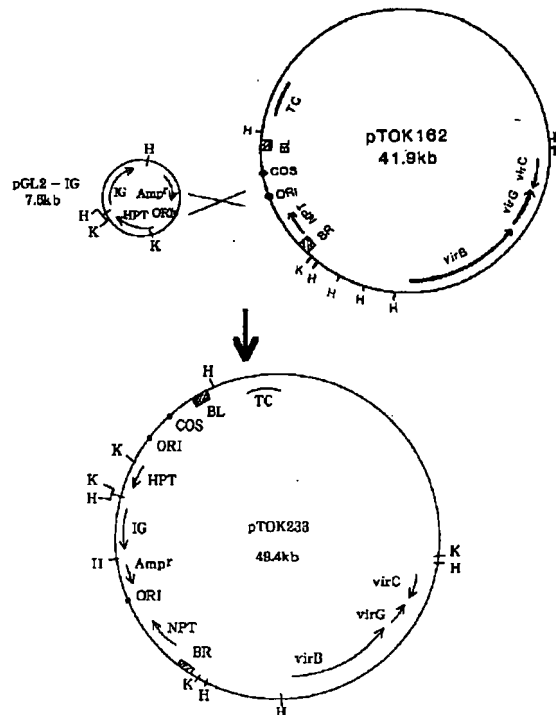
virG *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域中のvirG遺伝子

Vir アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir領域

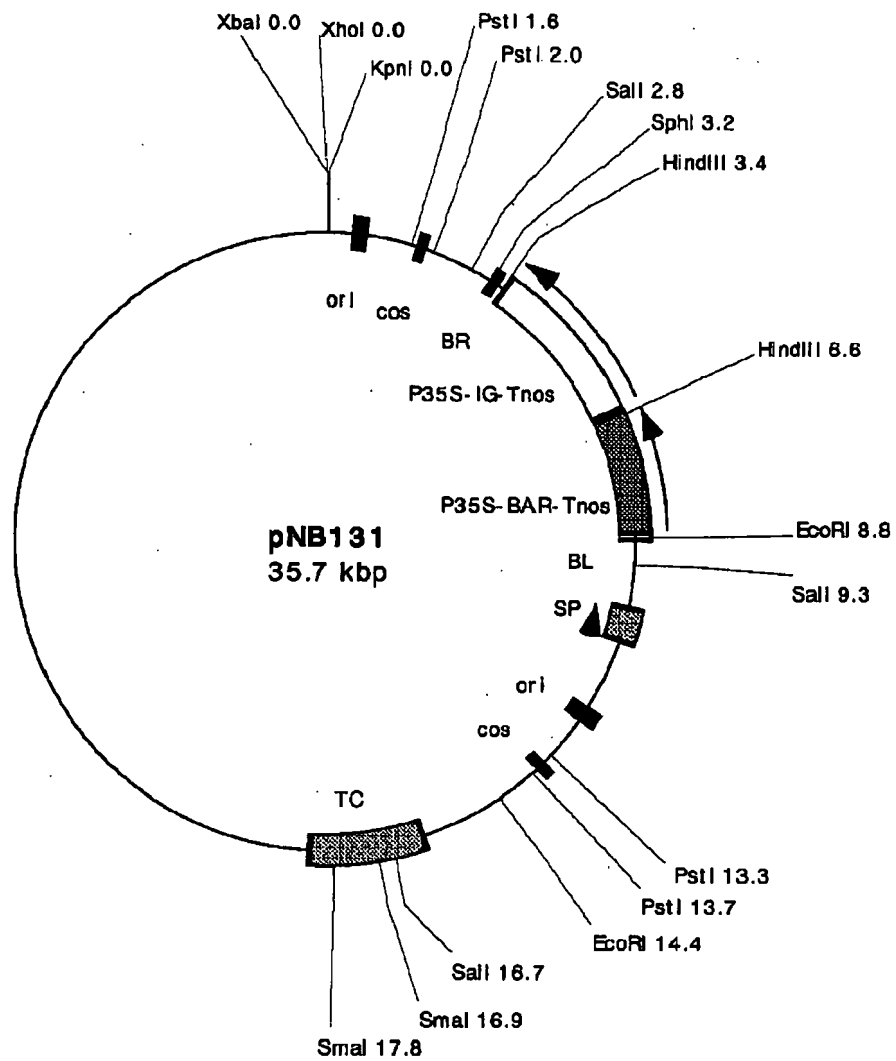
S Vir 強病原性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域

s vir* TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

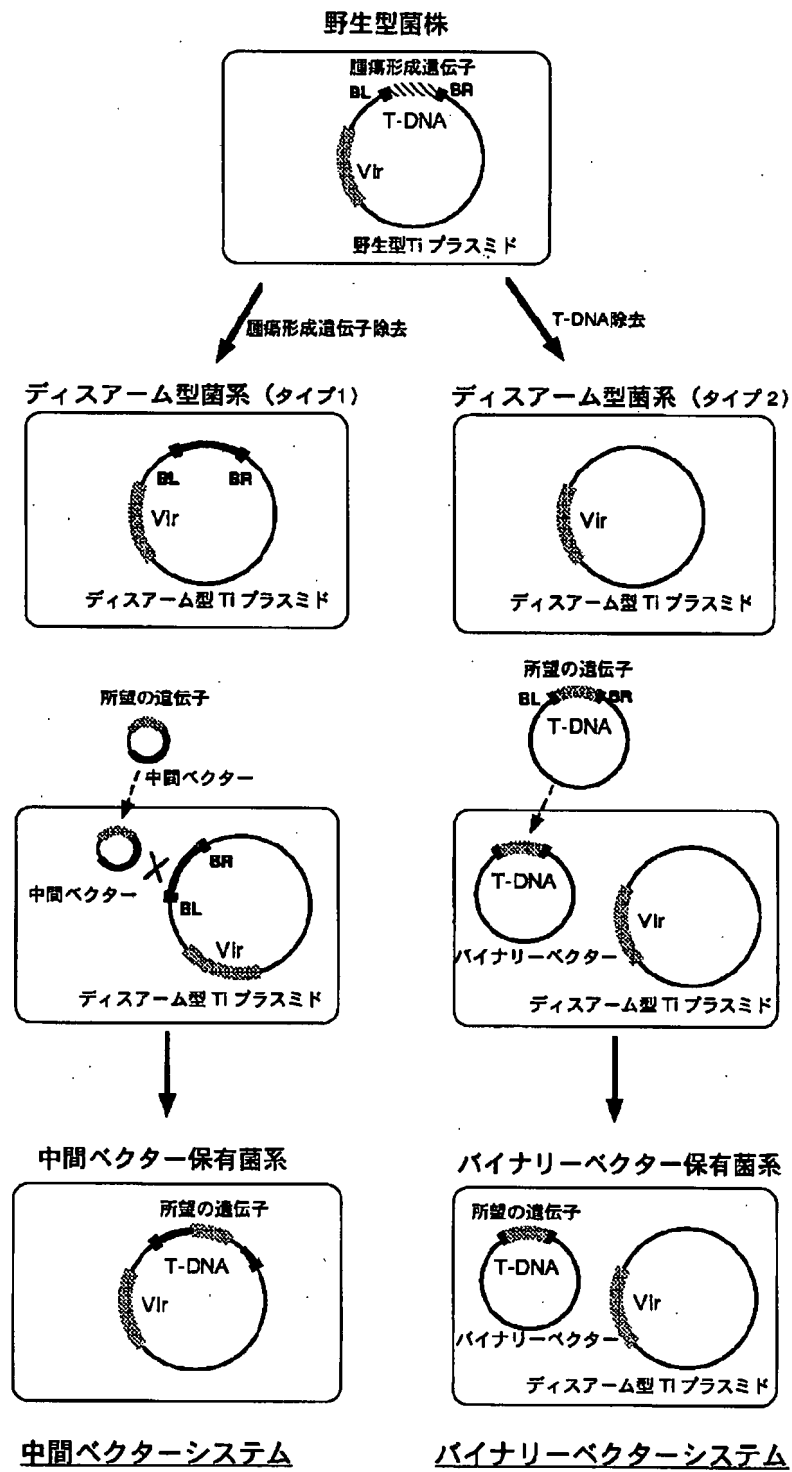
【図1】



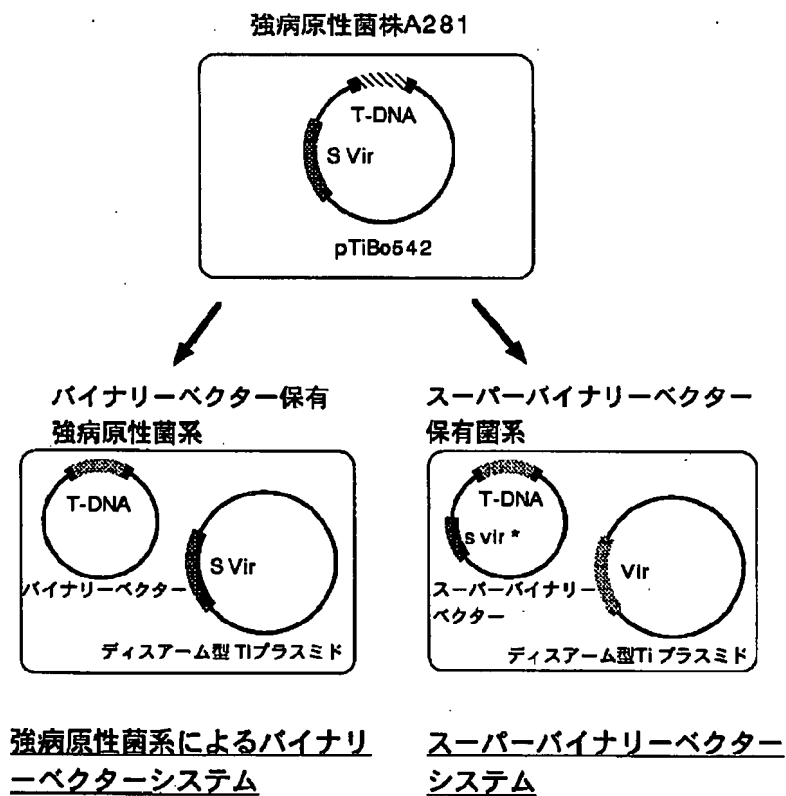
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 石田 祐二
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た
ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA19 CB03
CD03 CD06 CD09 CD13 CD14
CD17
4B024 AA08 DA01 GA11 HA20